مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۵، شماره ۵، آذر و دی ۱۳۹۹(شماره پی در پی ۱۴۲)

شناسایی ترکیبات اسانس گیاه دارویی همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.) و مقایسه اثرات آنتی‌اکسیدانی اسانس آن با بوتیل هیدروکسی تولوئن در پایداری روغن خوراکی کانولا

زهرا ایزدی[۱*]، ناصر میرازی[۲]، مجید آقاعلیخانی[۳]

[۱] گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشگاه نهاوند، نهاوند، ایران ،[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران ،[۳] گروه اگروتکنولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ وصول:۱۳۹۹/۰۲/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: روغن کانولا به علت داشتن اسیدهای چرب غیر اشباع بالا، مستعد فساد اکسیداسیونی می‌باشد. یکی از راه‌های جلوگیری از اکسیداسیون روغن‌ها و چربی‌ها افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها است، اما با توجه به این‌که آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی به علت امکان سمی و سرطان‌زا بودن محدود شده است، بنابراین امروزه اسانس گیاهان دارویی و معطر به خاطر داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی به عنوان جایگزین آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در فرآورده‌های غذایی مطرح می‌باشند. گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.) گونه‌ای از تیره کاسنی است که کاربردهای متعددی در صنایع غذایی و دارویی دارد. هدف از این مطالعه تعیین و شناسایی ترکیبات اسانس گل همیشه بهار و مقایسه اثرات آنتی‌اکسیدانی اسانس آن با بوتیل هیدروکسی تولوئن در پایداری روغن خوراکی کانولا بود.

روش بررسی: این یک مطالعه تجربی می‌باشد که در سال ۱۳۹۸ در دانشگاه نهاوند انجام گرفت. استخراج اسانس از گل‌های همیشه بهار با استفاده از دستگاه کلونجر به روش تقطیر با آب انجام شد. جداسازی و شناسایی ترکیب‌های متشکله اسانس با استفاده از دستگاه‌های کروماتوگرافی گازی و گاز کروماتوگراف متصل شده به طیف‌سنج جرمی صورت گرفت. سنجش میزان ترکیبات فنلی اسانس نیز با روش فولین سیوکالتو انجام شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس با آزمون‌های مهار رادیکال‌های آزاد دی‌فنیل‌پیکریل‌هیدرازیل و بی رنگ شدن بتا کاروتن مورد بررسی قرار گرفت و با آنتی‌اکسیدان سنتزی بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) مقایسه شد. سپس اثر اسانس در چهار غلظت(۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ پی‌پی‌ام) به روغن کانولا بدون آنتی‌اکسیدان جهت تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی اضافه شد. هم‌چنین یک نمونه روغن بدون آنتی‌اکسیدان(نمونه شاهد) و دو نمونه روغن حاوی ۱۰۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام آنتی‌اکسیدان BHT نیز جهت مقایسه قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس‌ها تهیه گردید. نمونه‌های روغن در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد طی ۳۵ روز نگهداری شدند و عدد پراکسید، اسید تیوباربیتوریک، عدد اسیدی و عدد کربونیل هر هفته اندازه‌گیری گردید. داده‌های آماری با استفاده از آزمون‌های آماری چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

یافته‌ها: مهم‌ترین ترکیبات موجود در اسانس گل همیشه بهار آلفا- کادینول(۴۹/۵۲ درصد)، گاما- کادینن(۱۵/۳۵ درصد) و دلتا- کادینن(۸/۳۶ درصد) بودند. مقدار ترکیبات فنولی برابر با ۳۲/۷۴±۰/۶۳ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم اسانس بود. میزان IC_{50} اسانس این گیاه ۱۰/۳۶±۰/۲۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد، در حالی که این پارامتر برای BHT ۹/۱۴±۰/۱۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. غلظت ۸۰۰ پی‌پی‌ام اسانس گل همیشه بهار فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتری نسبت به سایر غلظت‌های اسانس نشان داد. هم‌چنین مشاهده شد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی با افزایش غلظت اسانس ارتباط مستقیم داشت. در بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف اسانس گل همیشه بهار در روغن کانولا مشخص شد، بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به نمونه روغن حاوی ۸۰۰ پی‌پی‌ام اسانس بود که باBHT در غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام اختلافی معنی‌داری نداشت($p>0/05$).

نتیجه‌گیری: اسانس گل همیشه بهار در غلظت ۸۰۰ پی‌پی‌ام در روغن کانولا اثر آنتی‌اکسیدانی داشته و می‌تواند آنتی‌اکسیدان طبیعی مناسبی به عنوان جایگزین برای آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در صنعت روغن باشد.

واژه‌های کلیدی: همیشه بهار، اسانس، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، روغن کانولا، آلفا- کادینول

***نویسنده مسئول: زهرا ایزدی**، نهاوند، دانشگاه نهاوند، گروه علوم و مهندسی باغبانی

Email:armaghan_iza_2004@yahoo.com

مقدمه

چربی‌ها و روغن‌ها از جایگاه ویژه‌ای در رژیم غذایی انسان برخوردار هستند و سهم عمده‌ای از نیاز بدن به انرژی را تأمین می‌کنند. اخیراً با رشد دانش عمومی، تقاضای مردم برای مصرف روغن‌هایی که علاوه بر تأمین انرژی و ایجاد طعم در سلامتی هم مفید باشند، افزایش یافته است(۱). روغن‌های خوراکی حاوی مقادیر بالایی از اسیدهای چرب غیر اشباع می‌باشند که بسیار مستعد اکسیداسیون هستند. اکسیداسیون لیپیدها در حین نگهداری و فراوری محصولات غذایی به دلیل وجود تعداد قابل توجهی پیوند دوگانه رخ می‌دهد که علاوه بر کاهش کیفیت تغذیه‌ای آن‌ها، سبب تولید رادیکال‌های آزاد و هیدروپراکسیدها می‌شود(۲). این رادیکال‌های آزاد باعث اکسیداسیون خود به خودی و تولید ترکیبات شیمیایی نامطلوب و در نتیجه موجب بد طعمی و تندی در ماده غذایی می‌گردند. هم‌چنین جذب این ترکیبات در بدن سبب بروز بیماری‌های مختلفی اعم از آلزایمر، سرطان، پیری و بیماری‌های قلبی می‌شوند(۳). روغن کانولا یکی از پر مصرف‌ترین روغن‌های نباتی در بازار جهان است. روغن کانولا خام غنی از منابع اسیدهای چرب امگا ۳، آنتی‌اکسیدان(پلی‌فنل‌ها، توکوفرول، استرول‌ها، کارتنوئیدها) و دیگر مواد مغذی ضروری برای سلامت انسان می‌باشد. به منظور جلوگیری از اکسیداسیون ترکیبات غیر اشباع در این روغن از آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی نظیر؛ بوتیلات هیدروکسی آنیزول[1]، بوتیلات هیدروکسی تولوئن[2] و تری بوتیل هیدروکینون[3] در صنعت استفاده می‌شود که با توجه به اثرات نامطلوب آنها در حال حذف و جایگزینی به وسیله آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌باشند(۴). با توجه به موارد فوق، تمایل به استفاده از عصاره و اسانس گیاهان به جای آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی رو به افزایش است و پژوهش‌های زیادی روی این مواد برای جلوگیری از اکسیداسیون روغن‌های خوراکی صورت گرفته است(۶ و۵). برخی از محققان گزارش داده‌اند که بسیاری از مواد افزودنی طبیعی نسبت به انواع مصنوعی، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و پایداری حرارتی بالاتری در روغن‌های خوراکی هستند(۷).

گیاه دارویی همیشه بهار[4] از خانواده کاسنی[5]، گیاهی بوته‌ای، معطر، دارویی و زینتی با گل‌های زرد و نارنجی و بومی منطقه مدیترانه است(۸). عمده‌ترین مواد مؤثر این گیاه شامل؛ ترپنوئیدها، ترکیبات فنولی، کومارین‌ها، کوئینون‌ها، کاروتنوئیدها و اسیدهای آمینه می‌باشد(۹). همیشه بهار گیاهی یک ساله با ساقه‌ای متشکل از شاخه‌های زیاد که با کرک‌های نرمی پوشیده شده است. ارتفاع آن به ۴۵ تا ۷۵ سانتی‌متر می‌رسد. برگ‌ها بیضوی، خمیده و پشت و روی برگ‌ها کرک‌دار می‌باشد(۱۰). عمده‌ترین مواد مؤثر این گیاه در گل‌ها تولید و تجمع می‌یابند. عصاره همیشه بهار دارای اثرات دارویی از قبیل؛ خواب‌آور،

1-Butylated Hydroxy Anisole(BHA)
2-Butylated Hydroxy Toluene(BHT)
3-Tertiary Butylhydroquinone(TBHQ)
4-Calendula officinalis L.
5-Asteraceae

ضد التهاب پوستی، ضد قارچ و باکتری، ضد انگل، رقیق و تصفیه‌کننده خون است(۱۱). هم‌چنین از این گیاه به طور موضعی برای درمان زخم‌های جزیی، سوختگی و دیگر مشکلات پوستی استفاده می‌شود(۱۰). در طب سنتی از گل‌های همیشه بهار برای درمان تب و سرطان استفاده می‌شد که احتمالاً به دلیل خاصیت ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی آن بوده است(۱۱). جزء اصلی اسانس همیشه بهار آلفا- کادینول و گاما- کادینول می‌باشد(۱۳ و ۱۲). کومار و همکاران، آلفا- کادینول، کوبینول و گاما- کادینول را به عنوان اجزای اصلی اسانس همیشه بهار شناسایی کردند و نشان دادند که اسانس این گیاه فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی دارد که می‌توان از آن برای غذاهایی با چربی و فسادپذیری بالا به خوبی استفاده گردد(۱۴). در تحقیقی میزان ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدی عصاره همیشه بهار به ترتیب معادل ۳۳/۹۰ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره و ۲۴/۶۷ میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم عصاره گزارش شد(۱۵). در گزارشی میزان ترکیبات فنولی عصاره بومادران[1] برابر با ۸۰/۷۵ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره اعلام شد(۱۶). در گزارش سایتر و همکاران نیز میزان فنول گیاهان آفتابگردان[2]، سرخارگل[3] و شکر تیغال[4] به ترتیب ۱۰/۹۲، ۱۲/۹۳ و ۹/۸۰ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره گزارش گردید(۱۷).

طبق بررسی‌ها و داده‌های جمع‌آوری شده، تاکنون در مورد ترکیبات متشکله از اسانس همیشه بهار در رویشگاه نهاوند اطلاعاتی وجود ندارد. هدف از این مطالعه تعیین و شناسایی ترکیبات اسانس گل همیشه بهار و مقایسه اثرات آنتی‌اکسیدانی اسانس آن با بوتیل هیدروکسی تولوئن در پایداری روغن خوراکی کانولا بود.

روش بررسی

این یک مطالعه تجربی می‌باشد که در سال ۱۳۹۸ در دانشگاه نهاوند انجام گرفت. گل‌های گیاه همیشه بهار در مرحله گلدهی کامل از گلخانه آموزشی - پژوهشی دانشگاه نهاوند برداشت شد. بعد از انتقال گل‌ها به آزمایشگاه کشاورزی جهت رفع گرد و غبار گل‌ها با آب سرد به صورت سطحی شسته و در سایه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۳۸ درصد طی ۱۰ روز خشک گردید. سپس مقدار ۵۰۰ گرم از گل خشک شده به دستگاه کلونجر که اساس کار آن تقطیر آبی است، منتقل گردید و به مدت ۳ ساعت اسانس موجود استخراج و به وسیله سولفات سدیم رطوبت‌زدایی شد(۱۸). روغن کانولا تصفیه شده، رنگبری شده، بوگیری شده و بدون آنتی‌اکسیدان از کارخانه روغن نگین تهیه و تا روز قبل از آزمون به منظور جلوگیری از اکسیداسیون در فریزر ۱۷- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. کلیه مواد شیمیایی و حلال‌های مصرفی از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

1-*Achillea millefolium* L.
2-*Helianthus annuus* L.
3-*Echinacea purpurea* L.
4-*Echinops ritro* L.

به منظور جداسازی و شناسایی ترکیبات اسانس به ترتیب از دستگاه‌های کروماتوگرافی گازی[1] و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی[2] استفاده شد. پس از تزریق اسانس‌ها به دستگاه کروماتوگرافی گازی و یافتن مناسب‌ترین برنامه‌ریزی حرارتی ستون، برای دستیابی به بهترین جداسازی، اسانس‌های حاصل با دی‌کلرومتان رقیق شده و به دستگاه گاز کروماتوگراف کوپل شده با طیف‌سنج جرمی تزریق شد و طیف‌های جرمی و کروماتوگرام‌های مربوط به دست آمد. سپس با استفاده از زمان بازداری، شاخص بازداری، مطالعه طیف‌های جرمی و مقایسه با ترکیبات استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در نرم افزار SATURN ترکیبات تشکیل دهنده اسانس از نظر کمی و کیفی شناسایی شد(۱۹). برای محاسبه اندیس‌های بازداری از تزریق هیدروکربن‌های نرمال ۹ تا ۲۲ کربنه در شرایط برنامه‌ریزی حرارتی(مشابه با تزریق نمونه) استفاده شد. محاسبات کمی(تعیین درصد هر ترکیب) به کمک داده‌پرداز R_3A-Chromatepac به روش نرمال کردن سطح[3] و نادیده گرفتن ضرایب پاسخ[4] مربوط به طیف‌ها انجام شد(۲۰).

دستگاه گازکروماتوگراف مورد استفاده در این تحقیق، شیمادزو مدل ۹A مجهز به دتکتورFID (یونیزاسیون شعله هیدروژن) و داده پرداز Chromatepac بود. ستون دستگاه DB-5 به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۲۵ میکرون و ضخامت لایه فاز ساکن برابر ۰/۲۵ میکرون بود. سرعت جریان گاز حامل هلیم ۲۲/۷ سانتی‌متر بر ثانیه بود. دمای محفظه تزریق ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد، برنامه‌ریزی حرارتی ستون از دمای اولیه ۵۰ درجه سانتی‌گراد تا دمای نهایی ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد که هر دقیقه چهار درجه سانتی‌گراد به آن افزوده شد. دمای دتکتور ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی مورد استفاده در این تحقیق از نوع واریان مدل ۳۴۰۰ بود. ستون مشابه با ستون مورد استفاده در دستگاه GC بود. آشکارساز تله یونی گاز حامل هلیم، سرعت جریان گاز حامل ۵۰ میلی‌لیتر بر دقیقه و انرژی یونیزاسیون در طیف‌سنج جرمی معادل ۷۰ الکترون ولت بود. برنامه حرارتی ستون از ۴۰ تا ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۴ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه تنظیم شد. دمای محفظه تزریق ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد بود(۱۹).

مقدار فنول کل اسانس گل همیشه بهار طبق روش فولین سیوکالتو اندازه‌گیری شد، در این آزمون ۲۰ میکرولیتر از اسانس گل این گیاه با ۱۰۰ میکرولیتر از واکنشگر فولین سیوکالتو مخلوط شده و به مدت پنج دقیقه به هم‌زده شد. سپس ۳۰۰ میکرولیتر از محلول کربنات سدیم به آن اضافه و محلول به مدت دو ساعت در دمای اتاق تکان داده شد. در نهایت جذب محلول در ۷۶۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر ماورای بنفش در مقابل بلانک

1-Gas Chromatography(GC)
2-Response Factors
3-Gas chromatography–Mass Spectrometry(GC/MS)
4-Area Normalization Methods

(متانول) اندازه‌گیری شد. مقدار فنول کل اسانس گل همیشه بهار با استفاده از منحنی کالیبراسیون گالیک اسید اندازه‌گیری و گزارش شد(۲۱).

برای بررسی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی از روش به دام اندازی رادیکال دی فنیل پیکریل هیدرازیل(DPPH) [1] بر مبنای توانایی هیدروژن دهی استفاده شد. ارزیابی توانایی هیدروژن دهندگی عصاره‌ها و اسانس‌ها، به واسطه بی رنگ نمودن محلول متانولی ارغوانی رنگ DPPH اندازه‌گیری می‌شود(۲۲). در این ارزیابی طیف سنجی، از رادیکال پایدار دی فنیل پیکریل هیدرازیل به عنوان عامل واکنش دهنده استفاده شد. روش کار بدین صورت بود که ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف اسانس (۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ پی‌پی‌ام) به پنج میلی‌لیتر محلول متانولی ۰/۰۰۴ درصد DPPH افزوده شد و بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق، جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر در مقایسه با شاهد خوانده شد. بازداری رادیکال آزاد DPPH بر اساس درصد(I) از رابطه زیر محاسبه شد:

$I = (A_{blank} - A_{sample}) / A_{blank} \times 100$ درصد، که A_{blank} جذب محلول شاهد (حاوی همه مواد واکنشگر به جز اسانس) و A_{sample} جذب محلول حاوی غلظت‌های مختلف اسانس است. در این آزمایش نمونه حاوی متانول به همراه محلول DPPH به عنوان کنترل منفی فاقد آنتی‌اکسیدان یا اسانس و آنتی‌اکسیدان سنتزی بوتیلات هیدروکسی تولوئن(BHT) نیز به عنوان کنترل مثبت در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام استفاده شد(۲۲). به جهت بررسی بهتر فعالیت آنتی‌اکسیدانی از فاکتور IC_{50} [2] استفاده شد که بیانگر درصدی از اسانس است که قادر است ۵۰ درصد از رادیکال DPPH اولیه موجود در محیط را خنثی کند.

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس گل همیشه بهار با آزمون بی رنگ شدن بتاکاروتن در اثر اکسیداسیون اسید لینولئیک به روش آلام و همکاران انجام شد(۲۳). ۵ میلی‌گرم بتاکاروتن در ۵۰ میلی‌لیتر کلروفرم حل شد و ۳ میلی‌لیتر از محلول تهیه شده به فلاسک ته گردی که حاوی ۴۰ میلی‌گرم لینولئیک اسید و ۴۰۰ میلی‌گرم توئین ۲۰ بود، افزوده شد. پس از خارج شدن کلروفرم به وسیله گاز ازت، ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اشباع از اکسیژن به فلاسک افزوده شد و فلاسک برای تشکیل امولسیون به شدت هم زده شد. ۱/۵ میلی‌لیتر از امولسیون تهیه شده به لوله‌های آزمایش که حاوی ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف اسانس و استاندارد BHT بود، اضافه گردید و بلافاصله در زمان صفر جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۷۰ نانومتر خوانده شد. سپس درب لوله‌های آزمایش بسته و به مدت ۶۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۷۰ نانومتر خوانده شد. در این آزمایش BHT در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام به عنوان کنترل مثبت و کنترل منفی فاقد اسانس یا آنتی‌اکسیدان (فقط حاوی اتانول) بود. فعالیت

1-2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH)
2-The Half Maximal Inhibitory Concentration (IC_{50})

آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$I = (A_{sample(60)} - A_{control(60)}) / (A_{control(0)} - A_{control(60)}) \times 100$$ درصد

که در این رابطه $A_{sample(60)}$ میزان جذب نمونه بعد از ۶۰ دقیقه، $A_{control(60)}$ میزان جذب کنترل بعد از ۶۰ دقیقه، $A_{control(0)}$ میزان جذب کنترل در زمان شروع و I درصد بازداری می‌باشد.

به منظور بررسی کاربرد اسانس گل همیشه بهار به عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی در روغن کانولا، اسانس استخراج شده در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ پی‌پی ام و آنتی‌اکسیدان BHT در دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام به نمونه روغن فاقد آنتی‌اکسیدان در شیشه‌های تیره اضافه گردید و درب شیشه‌ها بسته شد. سپس نمونه‌ها به همراه کنترل منفی(روغن کانولا بدون افزودن اسانس و آنتی‌اکسیدان سنتزی) برای مدت ۳۵ روز در گرمخانه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و در غیاب نور نگهداری شدند. هر هفته (روزهای ۰، ۷، ۱۴، ۲۸ و ۳۵) ضمن هم زدن روغن‌ها، پایداری اکسایشی نمونه‌ها به وسیله پارامترهای عدد پراکسید، عدد اسیدی، عدد کربونیل و تیوباربیتوریک اسید اندازه‌گیری شد.

عدد پراکسید به عنوان معیاری از تشکیل ترکیبات اولیه اکسیداسیون است. برای اندازه‌گیری این شاخص، ۵ گرم از نمونه روغن توزین و پس از افزودن ۳۰ میلی‌لیتر حلال اسید استیک ـ کلروفرم (به نسبت ۱/۵ به ۱) و ۰/۵ میلی‌لیتر ید پتاسیم اشباع به آن به مدت یک دقیقه در محل تاریک قرار گرفت و سپس ۳۰ میلی لیتر آب مقطر به آن افزوده و با تیو سولفات سدیم ۰/۰۱ نرمال تا از بین رفتن رنگ زرد تیتر گردید. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف نشاسته به آن اضافه و عمل تیترسنجی تا از بین رفتن کامل رنگ موجود ادامه یافت(۲۴). مقدار عدد پراکسید با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید: $POV=(N \times V \times 1000)/M$ که در این رابطه POV عدد پراکسید برحسب میلی‌اکی‌والان اکسیژن در کیلوگرم روغن، N نرمالیته تیوسولفات سدیم، V حجم مصرفی تیوسولفات و M وزن نمونه است.

عدد اسید تیوباربیتوریک به عنوان شاخصی از تشکیل ترکیبات ثانویه اکسیداسیون، مطابق روش پروانه(۲۰۱۰) تعیین شد(۲۵). بر این اساس میزان ۰/۰۵ میلی‌لیتر نمونه روغن با ۰/۹۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۲ میلی‌لیتر واکنشگر TBA (۱۵ گرم تری‌کلرواستیک اسید، ۰/۳۷۵ گرم اسید تیوباربوتریک، ۲ میلی‌لیتر اسید کلریدریک و ۸۲/۹ میلی‌لیتر آب مقطر) با هم مخلوط شده و به مدت ۱۵ دقیقه در آب در حال جوش قرار گرفت. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق خنک شده و ۱۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد و در پایان میزان جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد.

برای اندازه‌گیری عدد اسیدی، ۱۵ گرم نمونه روغن در داخل ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری توزین و ۷۰ میلی‌لیتر حلال الکلی حل گردید. سپس چند قطره فنول فتالئین به عنوان معرف به آن اضافه و با پتاسیم هیدروکسید ۰/۱ نرمال تیتر شد.

عدد اسیدی طبق فرمول زیر به دست آمد(۲۶): AV=(N× V × ۵۶/۱۱)/W، که AV عدد اسیدی (میلی‌گرم بر گرم)، W وزن نمونه روغن (گرم)، V حجم هیدروکسید پتاسیم مصرفی (میلی‌لیتر) و N غلظت هیدروکسید پتاسیم (نرمال) است.

جهت بررسی عدد کربونیل از روش اسپکتروفتومتری و واکنشگر ۲ و۴-دی نیترو فنیل هیدرازین طبق روش فرهمندفر و همکاران و بر اساس فرمول زیر تعیین شد(۲۶): CV=A-۰/۳۰۶۷۵۲)/(۱۰۰× W×M)) که A، W، M و CV به ترتیب نشان دهنده میزان جذب نمونه روغن در طول موج ۴۲۰ نانومتر، وزن نمونه به گرم، شیب منحنی استاندارد و عدد کربونیل بر اساس میکرومول بر گرم می‌باشد.

تمامی آزمایش‌های ذکر شده سه بار تکرار شد و داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری دانکن تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

طیف کروماتوگرام در شکل ۱ و ترکیبات شیمیایی تشکیل دهنده اسانس گل همیشه بهار همراه با درصد فراوانی هر جزء در جدول ۱ ارایه گردیده است. در این آزمایش اسانس حاصل از گل همیشه بهار دارای ۳۵ ترکیب بود که در مجموع ۹۹/۱۲ درصد از کل اسانس را تشکیل می‌دهند. در میان ترکیبات شناسایی شده آلفاکادینول(۴۹/۵۲ درصد)، گاماکادینن(۱۵/۳۵ درصد) و دلتاکادینن(۸/۳۶ درصد) به ترتیب از اجزای اصلی اسانس می‌باشند(جدول ۱).

محتوی فنول اندازه‌گیری شده اسانس با استفاده از روش فولین سیوکالتو ۳۲/۷۴±۰/۶۳ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم اسانس بود. IC_{50} برای اسانس مورد نظر برابر با ۱۰/۳۶±۰/۲۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که در مقایسه با BHT (۹/۱۴±۰/۱۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر) ضعیف‌تر بود.

در این مطالعه توانایی اسانس گل همیشه بهار در غلظت‌های مختلف(۰ تا ۸۰۰ پی‌پی‌ام) در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH بررسی شد و نتایج با آنتی‌اکسیدان BHT در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام به عنوان کنترل مثبت مقایسه شد. با توجه به شکل ۲، با افزایش غلظت اسانس گل همیشه بهار قدرت مهار رادیکال‌های آزاد نیز افزایش معنی‌داری یافت ($p<۰/۰۵$). نتایج نشان داد که بین غلظت ۸۰۰ پی‌پی‌ام اسانس و غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام BHT تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد و بقیه غلظت‌های اسانس درصد مهارکنندگی کمتری نسبت به غلظت‌های BHT داشتند.

همان طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود با افزایش غلظت اسانس گل همیشه بهار فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز افزایش یافت. نتایج نشان داد که غلظت ۸۰۰ پی‌پی‌ام اسانس بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را دارا بود و تفاوت آن باBHT در غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام معنی‌دار نبود. در بین دو غلظت آنتی‌اکسیدانBHT، غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را داشت(شکل ۳). در هردو آزمون درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد و فعالیت

آنتی‌اکسیدانی هیچ اثری در گروه کنترل دیده نشد(شکل‌های ۲ و ۳).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس گل همیشه بهار و BHT در نمونه‌های مختلف روغن کانولا طی دوره نگهداری ۳۵ روز بر حسب اعداد پراکسید و اسید تیوباربیتوریک در جدول‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف اسانس گل همیشه بهار وBHT و زمان نگهداری بر اعداد پراکسید و اسید تیوباربیتوریک در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار است. همان طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود با گذشت زمان نگهداری، عدد پراکسید در تمامی نمونه‌ها افزایش یافت و با زمان‌های قبل از خود اختلاف معنی‌داری داشت($p<0/05$). با توجه به جدول ۲، در مرحله ابتدایی تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های روغن کانولا حاوی غلظت‌های مختلف اسانس گل همیشه بهار وBHT مشاهده نشد($p>0/05$). در روز هفتم بیشترین میزان عدد پراکسید به دست آمده مربوط به نمونه شاهد بود که حاوی هیچ گونه آنتی‌اکسیدانی نبود. نمونه‌های روغن کانولا حاوی ۱۰۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام اسانس گل همیشه بهار تفاوت معنی‌داری از لحاظ این شاخص با یکدیگر نشان ندادند و در مقایسه با نمونه‌های روغن حاوی هر دو غلظتBHT و همچنین غلظت ۸۰۰ پی‌پی‌ام اسانس گل همیشه بهار عدد پراکسید بیشتری داشتند. کمترین مقدار اکسیداسیون و بیشترین اثر آنتی‌اکسیدانی در نمونه روغن حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌امBHT حاصل شد. در میان نمونه‌های روغن حاوی اسانس گل همیشه بهار کمترین عدد پراکسید در نمونه روغن حاوی ۸۰۰ پی‌پی‌ام اسانس حاصل شد، هر چند تفاوت آن با نمونه روغن حاوی ۴۰۰ پی‌پی‌ام اسانس و ۱۰۰ پی‌پی‌ام BHT معنی‌دار نبود. در روز چهاردهم روند تغییرات در شاخص پراکسید از لحاظ آماری مشابه نتایج روز هفتم بود، اما برخلاف روز هفتم نمونه‌های روغن کانولا حاوی ۴۰۰ و ۸۰۰ پی‌پی‌ام اسانس گل همیشه بهار تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نشان دادند. در این روز نیز همچنان نمونه روغن حاوی ۸۰۰ پی‌پی‌ام اسانس گل همیشه بهار همگام با نمونه روغن حاوی ۱۰۰ پی‌پی‌ام BHT به یک میزان عدد پراکسید را کاهش داد، اما نمونه روغن حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام BHT تفاوت معنی‌داری با نمونه روغن حاوی ۸۰۰ پی‌پی‌ام اسانس گل همیشه بهار نشان داد. در بررسی نتایج شاخص پراکسید در روز بیست و هشتم مشخص گردید که بر خلاف روزهای هفتم و چهاردهم نمونه‌های روغن کانولا حاوی ۲۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام اسانس گل همیشه بهار تفاوت معنی‌داری را نشان دادند و قویترین اثر آنتی‌اکسیدانی نیز مربوط به نمونه روغن حاوی ۸۰۰ پی‌پی‌ام اسانس گل همیشه بهار بود و تفاوت آن با نمونه‌های روغن حاوی هر دو غلظت مورد بررسی BHT معنی‌دار نبود. در روز سی و پنجم با افزایش غلظت اسانس، همچنان قوی‌ترین اثر مربوط به نمونه روغن حاوی ۸۰۰ پی‌پی‌ام اسانس بود و فقط اثر آنتی‌اکسیدانی مشابهی با نمونه روغن حاوی ۱۰۰ پی‌پی‌امBHT داشت.

با توجه به جدول ۳ با گذشت زمان نگهداری، از روز هفتم عدد اسید تیوباربیتوریک در تمامی نمونه‌ها افزایش یافت و با زمان‌های قبل از خود اختلاف معنی‌داری داشت($p<0/05$). مقایسه اسید تیوباربیتوریک در نمونه‌های روغن کانولا حاوی

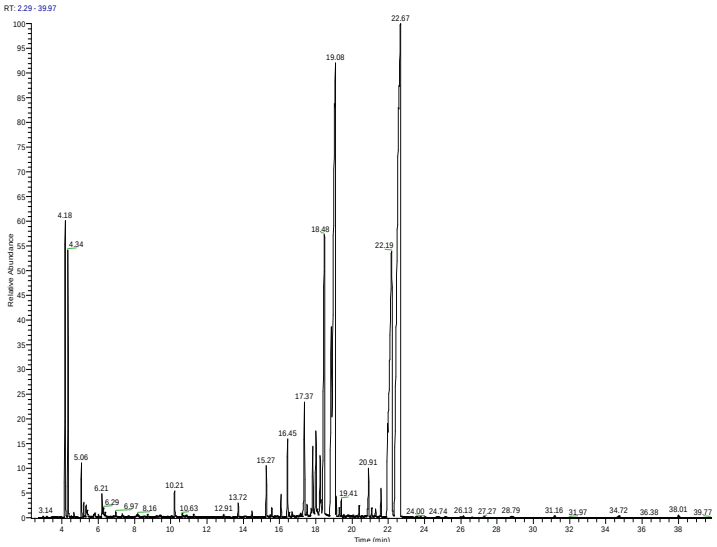
اسانس گل همیشه بهار وBHT در غلظت‌های مختلف نیز نشان داد که در مرحله ابتدایی تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های روغن مشاهده نشد(جدول ۳). در روز هفتم بیشترین و کمترین میزان عدد اسید تیوباربیتوریک به ترتیب مربوط به نمونه‌های شاهد و ۲۰۰ پی‌پی‌ام BHT بود. در بین نمونه‌های روغن حاوی اسانس گل همیشه بهار، نمونه‌های حاوی ٤۰۰ و ۸۰۰ پی‌پی‌ام کمترین شاخص اسید تیوباربیتوریک را داشتند و تفاوت آن‌ها با نمونه روغن حاوی ۱۰۰ پی‌پی‌ام BHT معنی‌دار نبود. در روزهای چهاردهم و بیست و هشتم همانند روز هفتم بیشترین و کمترین این شاخص را به ترتیب نمونه‌های شاهد و ۲۰۰ پی‌پی‌ام BHT داشتند. با افزایش غلظت اسانس میزان این شاخص کاهش یافت، به طوری که نمونه روغن حاوی ۸۰۰ پی‌پی‌ام اسانس گل همیشه بهار بهترین نمونه روغن در کاهش اسید تیوباربیتوریک بود و از لحاظ آماری قابلیت جایگزینی با هر دو نمونه روغن حاوی BHT را داشت. در روز سی و پنجم نیز نتایج موید آن بود که در این روز نمونه شاهد به علت نداشتن آنتی‌اکسیدان بالاترین شاخص اسید تیوباربیتوریک را داشت. برخلاف روزهای چهاردهم و بیست و هشتم که نمونه روغن حاوی ۸۰۰ پی‌پی‌ام اسانس گل همیشه بهار از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با نمونه روغن حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام BHT نداشت، ولی در این روز تفاوت معنی‌داری با نمونه روغن مذکور پیدا کرد.

نتایج مربوط به تغییرات عدد اسیدی نمونه‌های روغن کانولا طی دوره نگهداری در شکل ٤ نشان داده شده است. روند افزایشی عدد اسیدی پس از روز هفتم در تمامی نمونه‌ها طی دوره نگهداری مشاهده شد. نمونه‌های روغن حاوی هر دو غلظت BHT و ۸۰۰ پی‌پی‌ام اسانس گل همیشه بهار بهتر از بقیه نمونه‌ها عمل نمودند. مقایسه میزان عدد اسیدی در غلظت و زمان‌های مختلف نگهداری حاکی از آن بود که طی سی و پنج روز نگهداری، نمونه شاهد فاقد آنتی‌اکسیدان بالاترین عدد اسیدی(۱/۴۲ میلی‌گرم بر گرم) را داشت و کمترین عدد اسیدی(۰/۴۶ میلی‌گرم بر گرم) مربوط به نمونه روغن حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام BHT بود که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر داشتند($p<0/05$). هم‌چنین در بین نمونه‌های روغن حاوی اسانس گل همیشه بهار نیز کمترین عدد اسیدی(۰/۵۷ میلی‌گرم بر گرم) متعلق به نمونه روغن حاوی ۸۰۰ پی‌پی‌ام اسانس بود(شکل ۴).

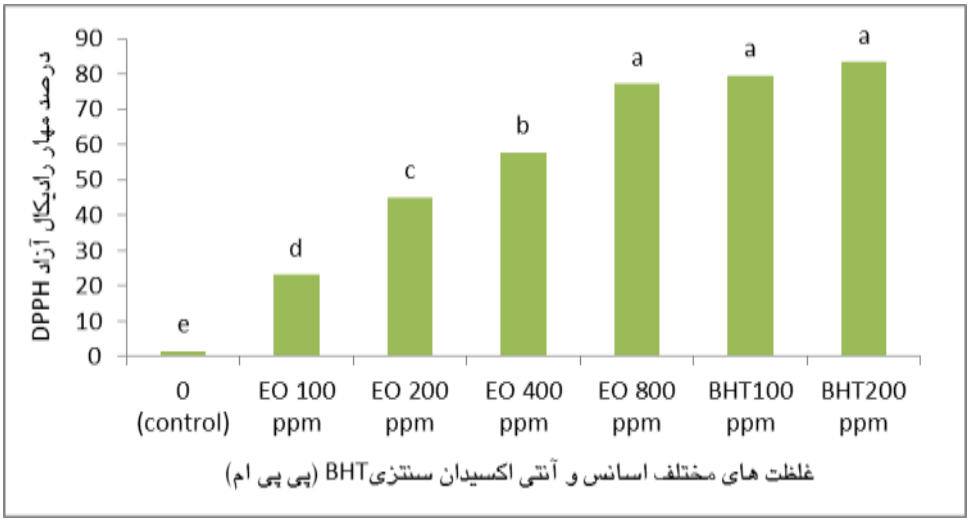
اندیس کربونیل به منظور تخمین محصولات ثانویه اکسیداسیون چربی اندازه‌گیری می‌شود. در تمامی نمونه‌های مورد بررسی، روند تغییرات عدد کربونیل طی دوره نگهداری افزایشی بود(شکل ۵). در روز شروع، تمامی نمونه‌ها مشابه هم عمل نمودند و تفاوتی معنی‌داری بین نمونه‌ها مشاهده نشد، اما بعد از آن فقط نمونه‌های روغن کانولا حاوی هر چهار غلظت اسانس گل همیشه بهار و ۱۰۰ پی‌پی‌ام BHT، در کنترل عدد کربونیل طی انبارداری مشابه هم عمل نمودند و اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند($p>0/05$). بیشترین مقدار عدد کربونیل(۵۸/۱۴ میکرومول بر گرم) در نمونه شاهد مشاهده شد، در حالی که نمونه روغن حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام BHT کمترین عدد کربونیل(۱۸/۴۵ میکرومول بر گرم) را در بین نمونه‌های مورد بررسی داشت($p<0/05$).

جدول۱: ترکیبات شیمیایی و مقادیر آن‌ها در اسانس گل همیشه بهار(*Calendula officinalis L.*)

ردیف	ترکیب	شاخص بازداری	زمان بازداری	میزان ترکیب (درصد)
۱	α-Pinene	۹۲۵	۳/۱۴	۰/۷۵
۲	Sabinene	۹۳۱	۳/۲۵	۰/۱۰
۳	β- Pinene	۹۶۶	۳/۵۵	۰/۱۲
۴	Myrcene	۹۸۱	۴/۰۱	۰/۰۴
۵	*P*-Cymene	۱۰۰۵	۴/۱۸	۱/۲۴
۶	Decanal	۱۱۲۶	۴/۳۴	۰/۸۶
۷	α-Terpinen-7-al	۱۲۳۶	۵/۰۶	۰/۴۸
۸	β -Farnesene	۱۳۲۵	۵/۷۸	۰/۲۱
۹	α -Humulene	۱۴۳۲	۶/۲۱	۰/۴۵
۱۰	α _Patchoulene	۱۴۵۹	۱۰/۲۱	۱/۰۳
۱۱	γ -Gurjunene	۱۴۶۳	۱۰/۶۳	۰/۰۵
۱۲	γ -Muurolene	۱۴۷۱	۱۵/۲۷	۰/۴۷
۱۳	α -Muurolene	۱۴۸۹	۱۶/۴۵	۰/۶۳
۱۴	Ledene	۱۴۹۵	۱۷/۳۷	۰/۵۳
۱۵	γ -Cadinene	۱۵۰۴	۱۹/۰۸	۱۵/۳۵
۱۶	Cubebol	۱۵۱۵	۱۹/۴۱	۱/۲۸
۱۷	Calamenene	۱۵۲۱	۲۰/۹۱	۲/۵۲
۱۸	Δ-Cadinene	۱۵۲۳	۲۲/۱۹	۸/۳۶
۱۹	α -Calcorene	۱۵۴۲	۲۲/۲۲	۲/۲۳
۲۰	β -Calacorene	۱۵۵۵	۲۲/۲۹	۰/۷۴
۲۱	Guaiol	۱۵۶۳	۲۲/۳۴	۰/۰۳
۲۲	Spathulenol	۱۵۷۴	۲۲/۳۸	۰/۳۶
۲۳	Caryophyllene oxide	۱۵۸۵	۲۲/۴۳	۰/۸۳
۲۴	β -Acorenol	۱۵۹۸	۲۲/۴۹	۰/۶۵
۲۵	Cadinol	۱۶۱۴	۲۲/۵۳	۰/۸۲
۲۶	Muurolol	۱۶۳۰	۲۲/۵۷	۰/۰۲
۲۷	α -Patchouli alcohol	۱۶۵۲	۲۲/۶۱	۰/۶۷
۲۸	Bulnesol	۱۶۶۱	۲۲/۶۵	۰/۵۶
۲۹	α -Cadinol	۱۶۷۴	۲۲/۶۷	۴۹/۵۲
۳۰	Eudesmol	۱۶۸۱	۲۴/۰۰	۰/۹۱
۳۱	*cis*-Sabinenene hydrate	۱۶۹۹	۲۴/۲۱	۰/۴۲
۳۲	α -Bisabolol	۱۷۲۱	۲۴/۵۰	۱/۲۳
۳۳	Pentacosane	۱۷۷۵	۲۴/۶۵	۳/۷۲
۳۴	Germacrene D	۱۷۸۱	۲۴/۷۲	۰/۷۵
۳۵	Cedryl methyl ketone	۱۷۸۹	۲۶/۱۳	۱/۱۹
	کل ترکیبات شناسایی شده			۹۹/۱۲
	مونوترپن‌ها			۳/۱۵
	سزکوئی ترپن‌ها			۸۶/۹۱
	ترکیبات دیگر			۹/۰۶

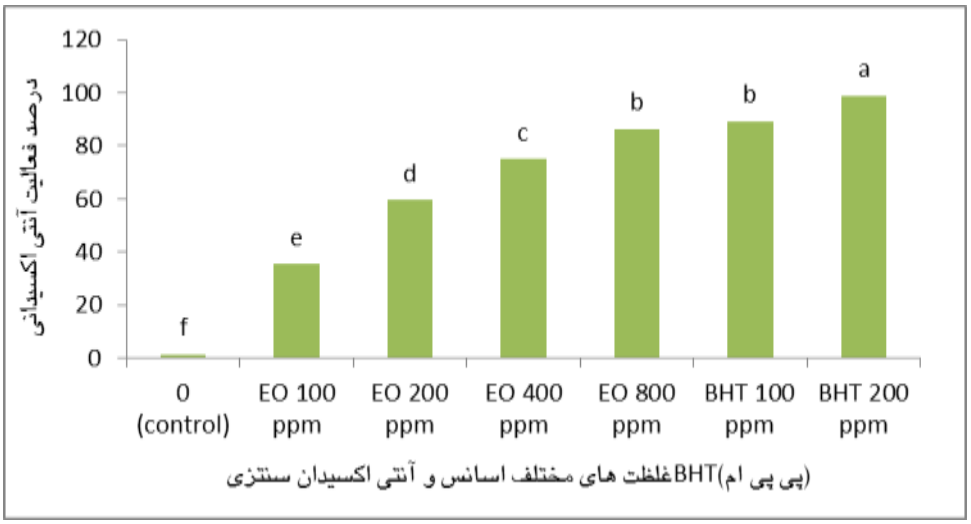


شکل ۱: طیف GC/MS ترکیبات شیمیایی اسانس گل همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.) حاصل از روش تقطیر با آب



شکل ۲: مقایسه میانگین قدرت احیاء کنندگی اسانس گل همیشه بهار و آنتی‌اکسیدان BHT در غلظت‌های مختلف

حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار براساس آزمون دانکن می‌باشند



شکل ۳: مقایسه میانگین فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس گل همیشه بهار و آنتی‌اکسیدان BHT در غلظت‌های مختلف
حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار براساس آزمون دانکن می‌باشند

جدول ۲: مقایسه میانگین‌های پراکسید(POV) برحسب میلی‌اکی‌والان اکسیژن در کیلوگرم روغن کانولا تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس گل همیشه بهار و آنتی‌اکسیدان BHT طی مدت ۳۵ روز

زمان نگهداری(روز) / نمونه	۰	۷	۱۴	۲۸	۳۵
۰ (کنترل)	۳/۲۱۶±۰/۵۳۰^{Ea}	۲۱/۳۵۰±۰/۱۱۰^{Da}	۶۶/۷۶۰±۰/۰۱۰^{Ca}	۱۰۹/۷۸۰±۰/۲۷۰^{Ba}	۱۹۷/۶۳۰±۱/۴۲۰^{Aa}
اسانس (۱۰۰ پی‌پی‌ام)	۳/۲۱۸±۰/۳۷۰^{Ea}	۱۹/۵۴۰±۰/۰۹۰^{Db}	۵۳/۱۹۰±۰/۱۵۰^{Cb}	۷۹/۹۸۰±۰/۹۶۰^{Bb}	۹۰/۳۶۰±۱/۵۴۰^{Ab}
اسانس (۲۰۰ پی‌پی‌ام)	۳/۲۱۹±۰/۲۵۰^{Ea}	۱۹/۱۵۰±۰/۶۵۰^{Db}	۵۲/۹۵۰±۱/۷۹۰^{Cb}	۷۶/۴۳۰±۱/۳۵۰^{Bb}	۸۳/۲۵۰±۰/۰۱۰^{Ac}
اسانس (۴۰۰ پی‌پی‌ام)	۳/۲۱۴±۰/۷۵۰^{Ea}	۱۸/۷۹۰±۰/۸۱۰^{Dbc}	۵۲/۷۵۰±۰/۶۱۰^{Cb}	۶۹/۳۱۰±۰/۰۲۰^{Bc}	۷۷/۷۸۰±۰/۹۱۰^{Ad}
اسانس (۸۰۰ پی‌پی‌ام)	۳/۲۱۷±۰/۸۴۰^{Ea}	۱۷/۱۷۰±۰/۵۳۰^{Dc}	۳۹/۴۸۰±۰/۰۱۰^{Cc}	۵۶/۴۴۰±۱/۷۴۰^{Bd}	۶۷/۱۸۰±۰/۴۹۰^{Ae}
BHT (۱۰۰ پی‌پی‌ام)	۳/۲۱۰±۰/۴۲۰^{Ea}	۱۶/۹۸۰±۰/۱۵۰^{Dc}	۳۹/۲۶۰±۱/۲۳۰^{Cc}	۵۵/۷۷۰±۰/۹۱۰^{Bd}	۶۶/۷۷۰±۰/۹۶۰^{Ae}
BHT (۲۰۰ پی‌پی‌ام)	۳/۲۱۲±۰/۰۵۰^{Ea}	۱۳/۰۳۰±۰/۹۶۰^{Dd}	۳۰/۰۳۰±۰/۰۵۰^{Cd}	۵۵/۲۱۰±۰/۴۷۰^{Bd}	۶۰/۱۲۰±۰/۲۸۰^{Af}

میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف بزرگ مشترک در یک ردیف بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد فاقد تفاوت معنی‌دار هستند.

میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف کوچک مشترک در یک ستون بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد فاقد تفاوت معنی‌دار هستند.

اعداد به صورت انحراف معیار استاندارد ± میانگین بیان شده است.

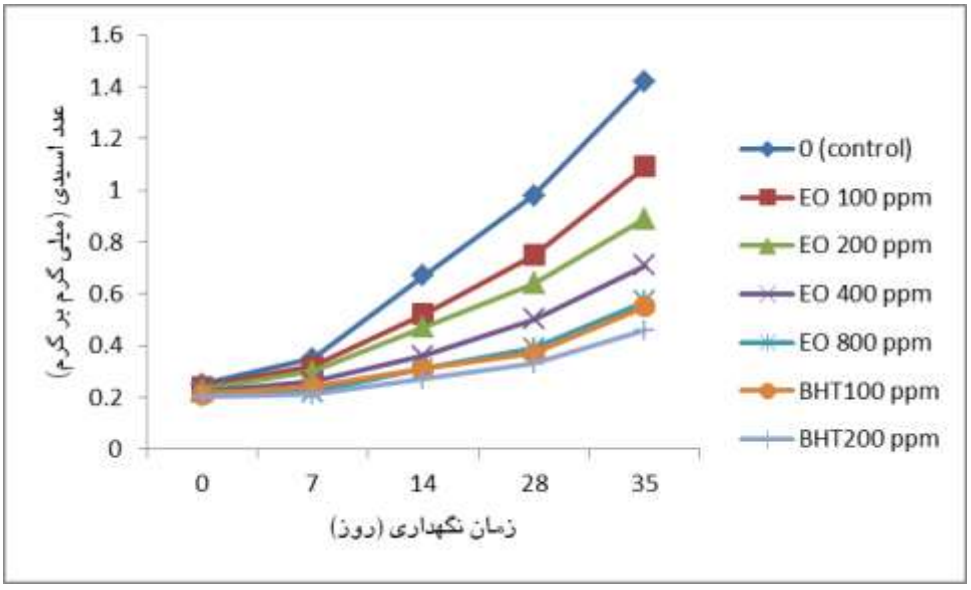
جدول ۳: مقایسه میانگین‌های تیوباربیتوریک اسید(TBA)برحسب میلی‌اکی‌والان مالون آلدئید در کیلوگرم روغن کانولا تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس گل همیشه بهار و آنتی‌اکسیدانBHT طی مدت ۳۵ روز

زمان نگهداری(روز) نمونه	۰	۷	۱۴	۲۸	۳۵
۰ (کنترل)	۰/۰۵۴±۰/۰۰۱ ^{Da}	۰/۰۷۳±۰/۰۰۲ ^{Da}	۰/۳۵۳±۰/۰۰۳ ^{Ca}	۰/۶۴۱±۰/۰۰۷ ^{Ba}	۰/۷۱۷±۰/۰۰۹ ^{Aa}
اسانس (۱۰۰ پی‌پی‌ام)	۰/۰۵۳±۰/۰۰۱ ^{Da}	۰/۰۶۷±۰/۰۰۱ ^{Db}	۰/۲۸۵±۰/۰۰۲ ^{Cb}	۰/۵۲۸±۰/۰۰۳ ^{Bb}	۰/۶۷۴±۰/۰۰۳ ^{Ab}
اسانس (۲۰۰ پی‌پی‌ام)	۰/۰۵۲±۰/۰۰۳ ^{Da}	۰/۰۶۵±۰/۰۰۵ ^{Db}	۰/۲۶۷±۰/۰۰۱ ^{Cc}	۰/۴۹۶±۰/۰۰۳ ^{Bc}	۰/۶۵۳±۰/۰۰۱ ^{Ac}
اسانس (۴۰۰ پی‌پی‌ام)	۰/۰۵۲±۰/۰۰۲ ^{Da}	۰/۰۵۱±۰/۰۰۳ ^{Dc}	۰/۲۶۲±۰/۰۰۴ ^{Cc}	۰/۴۹۳±۰/۰۰۶ ^{Bc}	۰/۶۱۵±۰/۰۰۲ ^{Ad}
اسانس (۸۰۰ پی‌پی‌ام)	۰/۰۵۱±۰/۰۰۱ ^{Da}	۰/۰۵۰±۰/۰۰۴ ^{Dc}	۰/۲۳۵±۰/۰۰۵ ^{Cde}	۰/۴۵۲±۰/۰۰۲ ^{Bde}	۰/۵۸۵±۰/۰۰۳ ^{Ae}
BHT (۱۰۰ پی‌پی‌ام)	۰/۰۵۱±۰/۰۰۴ ^{Da}	۰/۰۴۷±۰/۰۰۲ ^{Dcd}	۰/۲۴۰±۰/۰۰۲ ^{Cd}	۰/۴۵۷±۰/۰۰۱ ^{Bd}	۰/۵۸۳±۰/۰۰۲ ^{Ae}
BHT (۲۰۰ پی‌پی‌ام)	۰/۰۵۲±۰/۰۰۲ ^{Da}	۰/۰۴۳±۰/۰۰۱ ^{Dd}	۰/۲۳۱±۰/۰۰۱ ^{Ce}	۰/۴۴۸±۰/۰۰۲ ^{Be}	۰/۵۵۱±۰/۰۰۱ ^{Af}

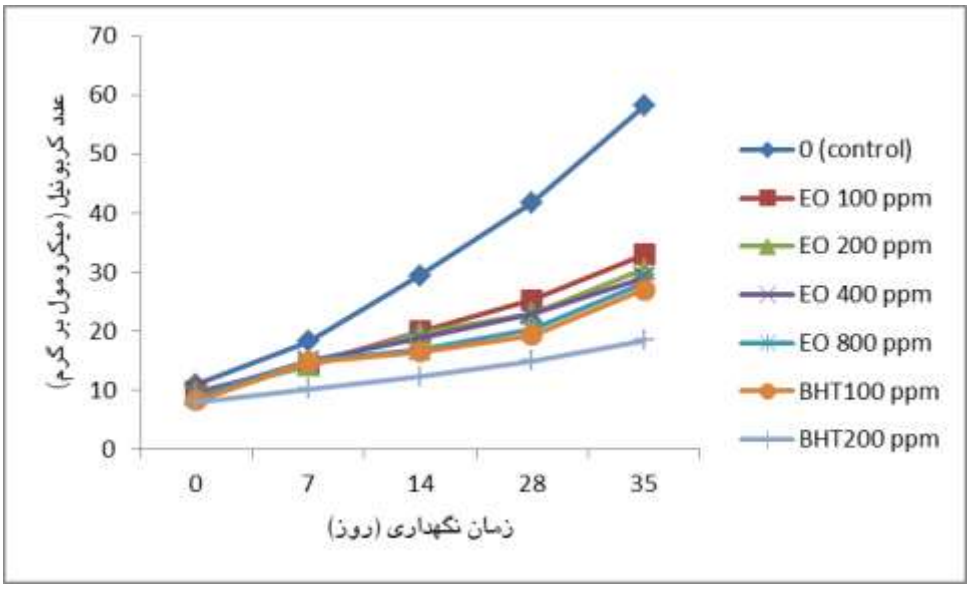
میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف بزرگ مشترک در یک ردیف بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد فاقد تفاوت معنی‌دار هستند.

میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف کوچک مشترک در یک ستون بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد فاقد تفاوت معنی‌دار هستند.

اعداد به صورت انحراف معیار استاندارد ± میانگین بیان شده است.



شکل ۴: مقایسه میانگین‌های عدد اسیدی روغن کانولا تحت تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس گل همیشه بهار و آنتی‌اکسیدان سنتزیBHT طی مدت ۳۵ روز



شکل ۵: مقایسه میانگین‌های عدد کربونیل روغن کانولا تحت تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس گل همیشه بهار و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT طی مدت ۳۵ روز

بحث

اکسیداسیون چربی یکی از علل عمده افت کیفیت مواد غذایی در طول نگهداری روغن و دیگر مواد غذایی حاوی چربی است. علاوه بر این، محصولات حاصل از اکسیداسیون لیپیدها سمی و ممکن است عوارض جانبی مانند؛ سرطان زایی، جهش‌زایی و پیری را داشته باشند. در سال‌های اخیر جایگزینی نگه دارنده‌های شیمیایی با نگه دارنده‌های طبیعی با منشا گیاهی مورد توجه تولید کنندگان مواد غذایی قرار گرفته است(۶)، لذا این مطالعه با هدف تعیین و شناسایی ترکیبات شیمیایی و سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس گل همیشه بهار و مقایسه اثر آنتی‌اکسیدانی اسانس آن با بوتیل هیدروکسی تولوئن در پایداری روغن خوراکی کانولا انجام شد.

سه ترکیب آلفا- کادینول، گاما- کادینن و دلتا- کادینن به ترتیب با مقادیر ۴۹/۵۲، ۱۵/۳۵ و۸/۳۶ درصد از اجزای اصلی اسانس بودند. بررسی همه جانبه نتایج نشان داد که کمیت و کیفیت مواد تشکیل دهنده اسانس همیشه بهار منطقه نهاوند با موارد گزارش شده از مناطق دیگر تفاوت دارد، به طوری که در تحقیقی که به وسیله پائولینی و همکاران انجام شد، مشخص گردید که شاخص‌ترین ترکیبات تشکیل دهنده همیشه بهار صحرایی[1] آلفا- کادینول(۳۸/۳۰ درصد)، جرماکرادین(۲۴/۹۰ درصد)، ۴- اپی- کوبیبول(۱۵/۲۰ درصد) و کوبیبول(۹/۲۰ درصد) بودند(۲۷). فاوستینو و همکاران عمده‌ترین ترکیب تشکیل دهنده اسانس همیشه بهار را

1-*Calendula arvensis* L.

آلفاـ بیسابولول(۷/۸۵ درصد) گزارش کردند(۱۳). همچنین تحقیق انجام شده به وسیله خالد و همکاران تا حدودی شباهت‌هایی از لحاظ نوع ترکیبات اصلی تشکیل دهنده این گیاه و تفاوت‌هایی از لحاظ درصد این ترکیبات را نشان داد(۱۲). همان طور که پژوهش‌ها نیز نشان داده‌اند ترکیبات شیمیایی اسانس همیشه بهار بر حسب نوع واریته، موقعیت جغرافیایی، محل رشد گیاه (نوع خاک، آب و هوا، ارتفاع از سطح دریا و میزان آب موجود) یا زمان جمع‌آوری گیاه می‌تواند متفاوت باشد و در نتیجه متابولیت‌های ثانویه متنوعی تحت شرایط محیطی و نیز ژنتیکی متفاوت بیوسنتز می‌شود(۲۸). بر اساس نتایج این تحقیق و بررسی‌های به عمل آمده در سایر پژوهش‌های موجود مشخص گردید که مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی تشکیل دهنده اسانس گل همیشه بهار در مناطق مختلف عمدتاً ساختارهای ترپنوئیدی داشته و تنها تفاوت‌های عمده در آن‌ها تغییر در درصد این گروه از مواد می‌باشد(۳۰ و ۲۹).

میزان فنول کل همیشه بهار برابر با ۳۲/۷۴±۰/۶۳ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم اسانس و میزان IC_{50} اسانس این گیاه نیز ۱۰/۳۶±۰/۲۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. پژوهش‌های محدودی جهت بررسی ترکیبات فنولی این گیاه انجام گردیده است. در گزارشی از ترکیه میزان ترکیبات فنولی اسانس همیشه بهار ۳۱/۲۵ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم اسانس اعلام شده است که در مقایسه با مقدار اندازه‌گیری شده در این مطالعه کمتر است(۳۱). همان طور که در این مطالعه مشاهده شد، می‌توان دریافت که اسانس همیشه بهار دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی منحصر به فردی بود و توانایی زیادی در کاهش رادیکال‌های آزاد DPPH داشت. هم‌چنین بر اساس نتایج این بررسی مشخص گردید که با افزایش غلظت اسانس، درصد بازدارندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت، به طوری که بیشترین درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و فعالیت آنتی‌اکسیدانی به ترتیب با میانگین ۷۷/۲۱ و ۸۶/۱۹ درصد در غلظت ۸۰۰ پی‌پی‌ام اسانس گل همیشه بهار حاصل شد. بین میزان فنول و فعالیت آنتی‌اکسیدانی رابطه مستقیمی وجود دارد(۳۲)، به نظر می‌رسد که در غلظت‌های بالاتر اسانس به دلیل افزایش میزان ترکیبات فنولی و به تبع آن افزایش گروه‌های هیدروکسیل، احتمال اهدای هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن افزایش قدرت مهارکنندگی در اسانس ایجاد می‌گردد(۳۳).ارستین و همکاران اثرات آنتی‌اکسیدانی همیشه بهار را وابسته به غلظت و اندکی کمتر از اسید اسکوربیک گزارش کرده و این اثر را به غلظت بالای ترکیبات فنولی در گیاه نسبت دادند(۳۱). هم‌چنین علت دیگر فعالیت ضد رادیکالی اسانس را می‌توان به حضور ترکیبات مونوترپن‌های آزاد اکسیژن‌دار و مخلوط هیدروکربن‌های مونوترپنی و سزکوئی ترپنی نسبت داد که با افزایش غلظت آن‌ها، فعالیت مهارکنندگی در اسانس نیز افزایش می‌یابد(۳۵ و ۳۴). در تحقیق حاضر نیز بالا بودن سهم آلفاـ کادینول، گاماـ کادینن

و دلتاـ کادینن در ترکیبات اسانس را می‌توان دلیلی بر بالا بودن قدرت آنتی‌اکسیدانی همیشه بهار دانست، این ترکیبات در حضور سایر ترکیبات موجود در اسانس، می‌توانند دارای فعالیت سینرژیستی آنتی‌اکسیدانی باشند(۳۶). چنان که الریفایی اظهار داشت، همیشه بهار رشد یافته در عربستان صعودی نیز غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بود(۳۷). آرورا و همکاران فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره و ترکیبات تشکیل دهنده اسانس همیشه بهار را مورد بررسی قرار دادند، بررسی‌ها نشان داد که بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به ترکیبات اکسیژن‌دار سپس ترکیبات فنولی و بعد از آن اسانس کامل و در نهایت هیدروکربن‌ها بود(۳۸). در تحقیق دیگری مشخص گردید که درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی برای عصاره همیشه بهار صحرایی ۹۲ درصد و برایBHT به عنوان کنترل مثبت ۹۶ درصد گزارش شده است(۳۹). آگاتونوویچ کاسترینا و همکاران با بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های همیشه بهار، بابونه آلمانی[1] و بابونه کبیر[2] با آزمون DPPH، میزان IC_{50} عصاره‌ها را به ترتیب؛ ۱۲/۲۲، ۸/۶۱ و ۵/۴۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین کردند(۴۰).

محصولات اولیه حاصل از اکسیداسیون روغن‌ها که همان هیدروپراکسیدها می‌باشند شاخصی در ارتباط با فساد شیمیایی روغن‌ها محسوب می‌شوند که میزان آن را با عدد پراکسید می‌سنجند. عدد پراکسید یکی از گسترده‌ترین آزمایش‌های مورد استفاده برای اندازه‌گیری تندشدگی اکسیداسیون در روغن‌ها و چربی‌ها است(۴۱). در این پژوهش در تمامی نمونه‌ها با افزایش زمان نگهداری، عدد پراکسید افزایش یافت که با نتایج علیخانی فرادنبه و همکاران و ابوطالبیان و همکاران مطابقت داشت(۴۲ و ۴۱). بالا رفتن عدد پراکسید به علت تشکیل هیدروپراکسیدها یا همان محصولات اولیه اکسیداسیون می‌باشد. در تمامی نمونه‌های مورد بررسی در همه روزها، نمونه روغن کانولا حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام BHT کمترین شاخص پراکسید را داشت و بعد از آن نمونه‌های روغن حاوی ۱۰۰ پی‌پی‌ام BHT و ۸۰۰ پی‌پی‌ام اسانس همیشه بهار قرار داشتند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی با عدد پراکسید نسبت عکس داشت، به طوری که هر چه فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت عدد پراکسید کمتر شد. در این مطالعه عدد پراکسید روغن وابسته به غلظت اسانس بود و با افزایش غلظت اسانس، عدد پراکسید کاهش و در نتیجه اثرات آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت. نمونه شاهد بالاترین عدد پراکسید را در تمامی روزها دارا بود که به دلیل عدم حضور آنتی‌اکسیدان افزوده شده به این نمونه بود و از آنجایی که عدد پراکسید روغن کانولا قبل از گرم‌خانه‌گذاری صفر نبود خود در تسریع اکسیداسیون مؤثر بود. عدد پراکسید شاخصی از حضور هیدروپراکسیدها(محصولات اولیه) بوده و تولید محصولات ثانویه اکسیداسیون را معلوم نمی‌کند. از این رو انجام آزمونی مانند تعیین عدد تیوباربیتوریک اسید که شاخصی از میزان پیشرفت

1-*Matricaria chamomilla* L.
2-*Tancetum parthenium* L.

اکسیداسیون و تولید محصولات ثانویه است، لازم به نظر می‌رسد. به طور کلی هرچه قدر درجه غیر اشباعیت روغن‌ها بیشتر باشد، روغن آمادگی بیشتری برای اکسید شدن دارد. وقتي ميزان پراكسيد به حد معینی برسد تغییرات مختلفی صورت گرفته و مواد فرار آلدهيدي و كتوني ايجاد می‌شوند که در ایجاد بو و طعم نامطبوع مواد چرب مؤثر می‌باشند و باعث بالا رفتن اندیس تیوباربیتوریک اسید می‌گردد(۴۳). بنابراین در روزهای پایانی از تجزیه پراکسیدها، مالون دی آلدهیدها تولید می‌شوند که بیانگر مراحل ثانویه اکسیداسیون می‌باشد. از آن‌جا که مالون دی‌آلدهید از تجزیه هیدروپراکسیدها حاصل می‌گردد، در روزهای ابتدایی مقدار تیوباربیتوریک اسید پایین است، اما با گذشت زمان و افزایش مقدار محصولات اولیه اکسیداسیون و شروع تجزیه این محصولات مقدار این اندیس نیز افزایش یافت. در این آزمون بین روز شروع و هفتم نگهداری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد که می‌توان گفت احتمالاً تا روز هفتم هنوز پراکسیدها به اندازه‌ای تجزیه نشده‌اند که مالون دی‌آلدهید کافی تولید گردد. با گذشت روزهای گرم‌خانه‌گذاری، مقدار این اندیس افزایش یافت، بنابراین می‌توان در این آزمایش نتیجه‌گیری کرد که روند تشکیل محصولات اولیه اکسیداسیون کاملاً شبیه به تشکیل محصولات ثانویه بوده و ارتباط خوبی در تغییرات تشکیل هر دو نوع محصول مشاهده شد. نتایج این پژوهش با نتایج چن و همکاران که اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره رزماری[1] را بر روغن آفتابگردان طی مدت زمان ۲۱ روز در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد بررسی نمودند، مطابقت داشت(۴۴). وانگ و همکاران نیز نشان دادند که غلظت ۱۲۰۰ پی‌پی‌ام اسانس گشنیز[2] دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به BHT در روغن آفتابگردان بود(۴۵). مطالعه‌ای در مورد اثرات آنتی‌اکسیدان اسانس فلفل سیاه[3] و زنجبیل[4] به وسیله چاندران و همکاران در روغن نارگیل انجام گرفت، آن‌ها نشان دادند در هر دو گیاه سرعت اکسیداسیون در نمونه‌ی شاهد بالاترین مقدار را داشت و هر چه غلظت اسانس در هر دو گیاه بیشتر شد، قدرت آنتی‌اکسیدانی آن هم افزایش یافت(۴۶). هاشمی و همکاران، فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن شیرازی[5] را در روغن آفتابگردان مورد بررسی قرار دادند، نتایج حاصل از اعداد پراکسید و اسید تیوباربیتوریک در مدت زمان ۱۴ روز نشان داد که غلظت‌های مورد بررسی اسانس این گیاه فعالیت آنتی‌اکسیدانی کمتری نسبت به آنتی‌اکسیدان BHT نشان دادند(٤٧).

کرامت و همکاران، فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن شیرازی و رزماری را در روغن زیتون بررسی کردند. اسانس هر دو گیاه با غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام به روغن زیتون اضافه شد و تغییرات عدد پراکسید و اسید تیوباربیتوریک در دمای ۶۰

1- *Rosmarinus officinalis* L.
2-*Coriandrum sativum* L.
3-Piper nigrum L.
4-*Zingiber officinale* L.
5-*Zataria multiflora* L.

درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۲ روز بررسی شد. نتایج نشان داد اسانس رزماری قادر به کاهش سرعت اکسیداسیون روغن زیتون بود و اثرات آن تفاوت معنی‌داری با آنتی‌اکسیدان‌های BHT و BHA در غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام نداشت(٤٨). در تحقیق دیگری مشخص گردید اسانس کلپوره[1] با غلظت ۶۰۰ پی‌پی‌ام اثرات قوی‌تری نسبت به BHA در روغن کانولا داشت(۴۹). یانگ و همکاران اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره رزماری را مورد بررسی قرار داده و مشاهده کردند عصاره این گیاه در غلظت ۴۰۰ پی‌پی‌ام فعالیت آنتی‌اکسیدانی نزدیک باBHT در غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام داشت(۵۰).

عدد اسیدی یک پارامتر مهم کیفیت مربوط به حضور اسیدهای چرب آزاد و دیگر ترکیبات غیر لیپیدی می‌باشد(۵۱). اسیدهای چرب آزاد از تجزیه تری گلیسیریدهای روغن طی نگهداری آن ایجاد می‌شوند و اندازه‌گیری عدد اسیدی و در نتیجه میزان اسیدهای چرب آزاد یک پارامتر مهم جهت اندازه‌گیری تند شدگی در غذاها می‌باشد(۵۲). عدد اسیدی عبارت است از میلی‌گرم پتاس مورد نیاز جهت خنثی کردن اسیدهای چرب آزاد موجود در یک گرم نمونه آزمایش می‌باشد. کمیسیون کدکس غذایی حداکثر مقدار اندیس اسیدی را برای روغن‌های تصفیه شده و روغن‌های دست نخورده به ترتیب ۰/۶ و ۴ میلی‌گرم هیدروکسید پتاسیم بر گرم روغن اعلام کرده‌اند(۵۳). روند تغییرات عدد اسیدی در تمام نمونه‌های مورد بررسی طی دوره نگهداری افزایشی بود. نگوین و همکاران نشان دادند که با گذشت زمان نگهداری، عدد اسیدی در تمام نمونه‌های روغن افزایش یافت که با نتایج به دست آمده از این پژوهش هم‌خوانی دارد(۵۴). وجود مقادیر بالای ترکیبات فنولی در اسانس همیشه بهار مسئول کاهش عدد اسیدی در نمونه‌های حاوی اسانس نسبت به نمونه شاهد بود(۵۵). این نتایج با یافته‌های اثنی‌عشری و همکاران که اعلام کردند ترکیبات فنولی تأثیر مهمی بر پایداری اکسیداسیون روغن دارد، مطابقت دارد(۵۶). فرهمندفر و همکاران به بررسی تأثیر عصاره نعناع فلفلی[2] بر پایداری اکسایشی روغن سویا پرداختند و نشان دادند که در نمونه‌های حاوی عصاره، میزان عدد اسیدی روغن کمتر از نمونه شاهد فاقد عصاره بود(۵۷). مشیری روشن و همکاران نیز در بررسی عصاره دانه زنیان[3] بر پایداری روغن سویا نشان دادند که پایین‌ترین میزان عدد اسیدی در نمونه حاوی آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT مشاهده شد و کلیه غلظت‌های عصاره دانه زنیان باعث کاهش عدد اسیدی روغن در مقایسه با نمونه شاهد فاقد آنتی‌اکسیدان گردیدند(۵۸).

عدد کربونیل که نماد کمی ترکیبات کربونیل به عنوان مهم‌ترین ترکیبات ثانویه اکسایش لیپیدی(مانند آلدئیدها و کتون‌ها) است، شاخص بهتری در خصوص تغییرات اکسیداسیون روغن‌ها تلقی می‌گردد، زیرا این ترکیبات حایز پایداری بیشتری نسبت به هیدروپراکسیدها هستند و نیز سهم عمده‌ای در بروز

1-*Teucrium polium* L.
2-Mentha piperita L.
3-*Trachyspermum ammi* L.

طعم‌های تند و ناخوشایند روغن‌های اکسید شده دارند. عمدتاً بالا رفتن مقدار ترکیبات کربونیل در روغن به حضور اسیدهای چرب غیر اشباع نسبت داده می‌شود(۵۹). اندازه‌گیری مقدار کربونیل سنجشی است که محتوای محصولات ثانویه اکسیداسیون را در طول فرآیند سرخ کردن تخمین می‌زند. افزایش در عدد کربونیل با افزایش اکسیداسیون چربی مطابق است(۵۹). فرهمندفر و همکاران اعلام نمودند زمانی که میزان عدد کربونیل روغن‌های خوراکی به بیش از ۵۰ میکرومول بر گرم برسد روغن غیرقابل مصرف می‌باشد(۶۰). همان طور که مشاهده شد در کلیه نمونه‌ها به غیر از نمونه شاهد، عدد کربونیل در محدوده قابل قبولی قرار داشت. در تحقیقی مشخص گردید که نمونه‌های روغن کانولا که حاوی عصاره سبوس برنج طارم محلی بودند، عدد کربونیل پایین‌تری نسبت به نمونه روغن فاقد آنتی‌اکسیدان داشتند. هم‌چنین استفاده از آنتی‌اکسیدان TBHQ در روغن منجر به بهبود پایداری روغن و کاهش عدد کربونیل نسبت به نمونه شاهد گردید(۶۰). نتایج این آزمایش با نتایج فرهمندفر و همکاران مطابقت دارد(۶۰). دلفانیان و همکاران نشان دادند تمامی غلظت‌های عصاره عناب[1] عدد کربونیل کمتری نسبت به آنتی‌اکسیدان BHT داشتند(۶۱).

در خاتمه به عنوان مهم‌ترین عوامل محدود کننده این تحقیق می‌توان به کمبود دستگاه‌ها و امکانات آنالیز فیتوشیمیایی و هم‌چنین محدودیت اعتباری برای استفاده از سایر روش‌های تعیین خصوصیات آنتی‌اکسیدانی اشاره کرد.

تغییر طعم و بوی فرآورده‌های خوراکی در اثر به کارگیری مقدار زیاد اسانس‌های گیاهی سبب محدودیت استفاده از آن‌ها به عنوان نگهدارنده می‌گردد. در نتیجه برای حفظ امنیت خوراکی و حفظ طعم و بوی فرآورده استفاده هم‌زمان از چند نگهدارنده به میزان کم بهتر از به کارگیری مقدار زیاد هر یک از آن‌ها به تنهایی است. چه بسا بسیاری از اسانس‌های گیاهی اثر سودمند خود را به صورت هم افزایی بر یک یا چند محل هدف نشان می‌دهند(۶۲). از آنجا که اثرات آنتی‌اکسیدانی گیاهان بومادران[2]، بابونه، ترخون[3] و ماریتیغال[4] در پژوهش‌های مختلفی ثابت شده(۶۴ و۶۳) و این گیاهان هم خانواده همیشه بهار هستند و هم‌چنین از نظر طعم مورد پسند مصرف کنندگان واقع می‌شوند، پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های آتی تیمارهای تلفیقی اسانس همیشه بهار با اسانس این گیاهان در غلظت‌های متفاوت بررسی شوند، هم‌چنین پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های بعدی به منظور مشاهده اثرات آنتی‌اکسیدانی اسانس همیشه بهار از غلظت‌های بالاتر و مدت زمان نگهداری بیشتر نیز استفاده شود.

1-*Ziziphus mauritiana* L.
2-*Achillea millefolium* L.
3-*Artemisia dracunculus* L.
4-*Silybum marianum* L.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که سه ترکیب آلفا- کادینول، گاما-کادینن و دلتا- کادینن به عنوان اجزای اصلی اسانس همیشه بهار شناسایی شدند، هم‌چنین اسانس این گیاه غنی از ترکیبات فنولی بود. بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس این گیاه با روش‌های انجام شده بیانگر این بود که غلظت ۸۰۰ پی‌پی‌ام اسانس همیشه بهار فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتری نسبت به سایر غلظت‌های اسانس، اما کمتر از آنتی‌اکسیدان BHT با غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام داشت. هم‌چنین در مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف اسانس و BHT در پایداری روغن کانولا در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد طی ۳۵ روز مشخص شد، اسانس همیشه بهار در غلظت ۸۰۰ پی‌پی‌ام قابلیت رقابت با آنتی‌اکسیدان BHT در غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام را داشت و حتی در برخی از هفته‌های آزمایش بین این غلظت با غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام BHT اختلافی دیده نشد. بنابراین می‌توان از اسانس همیشه بهار به عنوان جایگزین آنتی‌اکسیدان سنتزی در روغن استفاده کرد و علاوه بر حذف آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی، که می‌توانند با تجمع در بافت‌ها و اندام‌ها باعث ایجاد سرطان و تومور شوند، پایداری حرارتی روغن را بدون ایجاد تغییرات نامطلوب افزایش دهد.

تقدیر و تشکر

این پژوهش حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی جانوری با کد اخلاق IR.BASU.REC.1398,024 دانشگاه بوعلی سینا می‌باشد. نویسندگان مقاله از مسئولان محترم دانشگاه نهاوند که امکان انجام پژوهش حاضر را فراهم نمودند، کمال تشکر را دارند.

REFERENCES:

1.Bodoira RM, Penci MC, Ribotta PD, Martínez ML. Chia (*Salvia hispánica* L.) oil stability: study of the effect of natural antioxidants. LWT-Food Sci Technol 2017; 75: 107-13.
2.Santas J, Guzman Y, Guardiola F, Rafecas M, Bou R. Highthroughput analysis of lipid hydroperoxides in edible oils and fats vsing the fluorescent reagent diphenyl- 1 pyrenylphosphine. Food Chem 2014; 162: 235-41.
3.Fervavdes JCB, Draghi PF. Thermal stability of soybean oil: when must we discard it. MOJFPT 2016; 5:1-5.
4.Saviz A, Esmaeilzadeh Kenari R, Ali M, Kelagar K. Investigation of cultivate zone and ultrasound on antioxidant activity of Fenugreek leaf extract. J Appl Environ Biol Sci 2015; 4: 174–81.
5.Wojdylo A, Oszmianski J, Czemerys R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chem 2007; 105(3): 940-9.
6.Perez-Roses R, Risco E, Vila R, Penalver P, Canigueral S. Biological and non biological antioxidant activity of some essential oils. J Agric Food Chem 2016; 64(23): 4716-24.
7.Taghvaei M, Jafari SM, Mahoonak AS, Nikoo AM, Rahmanian N, Hajitabar J, et al. The effect of natural antioxidants extracted from plant and animal resources on the oxidative stability of soybean oil. LWT-Food Sci Technol 2014; 56(1): 124-30.
8.Jan N, John R. *Calendula officinalis* an important medicinal plant with potential biological properties. Proc Indian Natn Sci Acad 2017; 83: 769-87.
9.Shahrbabaki S, Zoalhasani S, Kodory M. Effects of sowing date and nitrogen fertilizer on seed and flower yield of pot marigold (*Calendula officinalis* L.) in the Kerman. Adv Environ Biol 2013; 7(13): 3925-9.
10.Baskaran K. Pharmacological activities of *Calendula officinalis*. Int J Sci Res 2017; 6(5): 43-7.
11.Kozlowska J, Stachowiak N, Prus W. Stability studies of collagen-based microspheres with *Calendula officinalis* flower extract. POLYM 2019; 163: 214-9.
12.Khalid AK, Teixeira da Silva JA. Yield, essential oil and pigment content of *Calendula officinalis* L. flower heads cultivated under salt stress conditions. Sci Hortic 2010; 126: 297-305.
13.Faustino MV, Seca AML, Silveira P, Silva AMS, Pinto DCGA. Gas chromatography–mass spectrometry profile of four Calendula L. taxa: A comparative analysis. Ind Crops Prod 2017; 104: 91-8.
14.Kumar Verma P, Raina R, Agarwal S, Kour H. Phytochemical ingredients and pharmacological potential of *Calendula officinalis* Linn. Pharm Biomed Res 2018; 4(2): 1-17.
15.Deuschle VCKN, Deuschle RAN, Piana M, Boligon AA, Bortoluzzi MRB, DAL PRÁ V, et al. Phytochemical evaluation and *in vitro* antioxidant and photo-protective capacity of *Calendula officinalis* L. Rev Bras Pl Med 2015; 17(4): 693-701.
16.Farhadi N, Babaei K, Farsaraei S, Moghaddam M. Changes in essential oil compositions, total phenol, flavonoids andantioxidant capacity of *Achillea millefolium* at different growth stages. Ind Crops Prod 2020; 152: 1-6.
17.Sytar O, Hemmerich I, Zivcak M, Rauh C, Brestic M. Comparative analysis of bioactive phenoliccompounds composition from 26 medicinal plants. Saudi J Biol Sci 2018; 25: 631-41.
18.Khalid AK, Teixeira da Silva JA. Yield, essential oil and pigment content of *Calendula officinalis* L. flower heads cultivated under salt stress conditions. Sci Hortic 2010; 126: 297-305.
19.Faustino MV, Seca AML, Silveira P, Siva AMS, Pinto DCGA. Gas chromatography–mass spectrometry profile of four Calendula L. taxa: A comparative analysis. Ind Crops Prod 2017; 104: 91-8.
20.Paolini J, Barboni T, Desjobert JM, Djabou N, Muselli A. Chemical composition, intraspecies variation and seasonal variation in essential oils of *Calendula arvensis* L. Biochem Syst Ecol 2010; 38: 865-74.
21.Rezaei M, Razmjoo J, Ehtemam MH, Karimmojeni H, Zahedi M. The interaction between shade and drought affects essential oil quantity and quality of *Vitex agnus-castus* L. leaves and seeds. Ind Crop Prod 2019; 137: 460-7.
22.Navarro-Rocha J, Fe Andrés M, Díaz CE, Burillo J, González-Coloma A. Composition and biocidal properties of essential oil from pre-domesticated Spanish *Satureja montana.* Ind Crop Prod 2020; 145: 1-6.
23.Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaaman R. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Phaem J 2013; 21(2): 143-52.

24.American Oil Chemists' Society (AOCS). Official methods of analysis of AOAC international. 17th ed. USA: Association of official analytical chemistry; 2002; 83.
25.Parvaneh V. Quality control and chemical analysis of foods. 8th ed. Tehran: Tehran university press; 2010; 325.
26.Farahmandfar R, Asnaashari M, Sayyad R. Comparison antioxidant activity of Tarom Mahali rice bran extracted from different extraction methods and its effect on canola oil stabilization. J Food Sci Technol 2015; 52(10): 6385-94.
27.Paolini J, Barboni T, Desjobert JM, Djabou N, Museli A, Costa J. Chemical composition, intraspecies variation and seasonal variation in essential oils of *Calendula arvensis* L. Biochem Syst Ecol 2010; 38(5): 865-74.
28.Oliveira GC, Vieira WL, Bertolli SC, Pacheco AC. Photosynthetic behavior, growth and essential oil production of *Melissa officinalis* L. cultivated under colored shade nets. Chil J Agric Res 2016; 76: 123–8.
29.Alizadeh Behbahani B, Shahidi F, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi SA, Mohebbi M. Antioxidant activity and antimicrobial effect of tarragon(*Artemisia dracunculus*) extract and chemical composition of its essential oil. J Food Meas Charact 2017; 11: 847-63.
30.Kartal N, Sokmen M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sokmen A. Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. Food Chem 2007; 100(2): 84-9.
31.Ercetin T, Sezer Senol F, Erdogan Orhan I, Toker G. Comparative assessment of antioxidant and cholinesterase inhibitory properties of the marigold extracts from *Calendula arvensis* L. and *Calendula officinalis* L.. Ind Crops Prod 2012; 36: 203-8.
32.Piluzza G, Bullitta S. Correlations between phenolic content and antioxidant properties in twenty-four plant species of traditional ethnoveterinary use in the Mediterranean area. Pharm Biol 2011; 49(3): 240-7.
33.Danila AO, Gatea F, Radu GL. Polyphenol composition and antioxidant activity of selected medicinal herbs. Chem Nat Compd 2011; 47: 22–6.
34.Foroutankhah M, Toghyani M, Landy N. Evaluation of *Calendula officinalis* L. (marigold) flower as a natural growth promoter in comparison with an antibiotic growth promoter on growth performance, carcass traits and humoral immune responses of broilers. Anim Nutr 2019; 5(3): 314-8.
35.Wang L, Zhang L, Li J, Cong J, Gao F, Zhou G. Effect of dietary marigold extract supplementation on growth performance, pigmentation, antioxidant capacity and meat quality in broiler chickens Asian-Australas. J Anim Sci 2017; 1: 71-7.
36.Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. Food Bioprod Process 2011; 89: 217–33.
37.AI-Rifai A. Identification and evaluation of in-vitro antioxidant phenolic compounds from the *Calendula tripterocarpa* Rupr. S Afr J Bot 2018; 116: 238-44.
38.Arora D, Rani A, Sharma A. A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus Calendula. Pharmacog Rev 2013; 7: 179–87.
39.Abudunia AM, Marmouzi I, Faouzi MEA, Ramli Y, Taoufik J, El Madani N, et al. Anticandidal, antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Calendula arvensis* flowers. J Mycol Med 2017; 27(1): 90-7.
40.Agatonovic-Kustrin S, Babazadeh Ortakand D, Morton DW, Yusof A. Rapid evaluation and comparison of natural products and antioxidant activity in calendula, feverfew, and German chamomile extracts. J Chromatogr A 2015; 1385: 103-10.
41.Alikhani Faradonbeh M, Esmaeilzadeh Kenari R, Ghaderi Ghahfarokhi M. Evaluation of antioxidant effect of Kiwifruit (*Actinidia deliciosa* L.) peel extract in comparison with TBHQ synthetic antioxidant on oxidative stability of soybean oil. J Food Sci Technol 2018; 82(15): 307-18.
42.Abootalebian M, Keramat J, Kadivar M, Ahmadi F, Abdinian M. Comparison of total phenolic and antioxidant activity of different *Mentha spicata* and *M.* Ann Agric Sci 2016; 61: 175–9.
43.Kabiri S, Sayyed Alangi SA. Comparison of Antioxidant effect of different extracts from Melissa officinalis leaves with immersion and microwave-assisted extractions and its oxidative stability on soybean oil. Innov Food Technol 2015; 2(4): 23-38.
44.Chen XQ, Zhang Y, Zu YG, Yang L, Lu Q, Wang W. Antioxidant effects of rosemary extracts on sunflower oil compared with synthetic antioxidants. Int J Food Sci Technol 2014; 49: 385–91.

45.Wang D, Fan W, Guan Y, Huang H, Yi T, Ji J. Oxidative stability of sunflower oil flavored by essential oil from *Coriandrum sativum* L. during accelerated storage. Lwt-Food Sci Technol 2018; 98: 268-75.
46.Chandran J, Nayana N, Roshini N, Nisha P. Oxidative stability, thermal stability and acceptability of coconut oil flavored with essential oils from black pepper and ginger. J Food Sci Technol 2017; 54: 144–52.
47.Hashemi MB, Niaakousari M, Saharkhiz MJ, Eskandari MH. Influenceof *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on oxidative stability of sunflower oil. Eur J Lipid Sci Tech 2011; 113: 1520–6.
48.Keramat M, Golmakani MT, Aminlari M, Shekarforoush S. Oxidative stability of virginolive oil supplemented with *Zataria multiflora* Boiss. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils during accelerated storage. J Food Process Pres 2017; 41: 1-12.
49.Sayyed R, Farahmandfar R. Influence of *Teucrium polium* L. essential oil on the oxidative stability of canola oil during storage. J Food Sci Technol 2017; 54: 3073-81.
50.Yang Y, Song XX, Sui XN, Qi BK, Wang ZJ, Li Y, et al. Rosemary extract can be used as a synthetic antioxidant to improve vegetable oil oxidative stability. Ind Crops Prod 2016; 80: 141–7.
51.Hao S, Wei Y, Li L, Yang X, Cen J, Huang H, et al. The effects of different extraction methods on composition and storage stability of sturgeon oil. Food Chem 2015; 173: 274-82.
52.Urbančič S, Kolar MH, Dimitrijević D, Demšar L, Vidrih R. Stabilisation of sunflower oil and reduction of acrylamide formation of potato with rosemary extract during deep-fat frying. LWT-Food Sci Technol 2014; 57(2): 671-8.
53.Barthet VJ, Gordon V, Daun JK. Evaluation of a colorimetric method for measuring the content of FFA in marine and vegetable oils. Food chem 2008; 111(4): 1064-8.
54.Nguyen QV, Nguyen NH, Eun JB. Antioxidant activity of Terminalia nigrovenulosa and Premna integrifolia extracts in soybean oil. Int Food Res J 2015; 22(1): 254-61.
55.Hashemia MB, Niakousariab M, Saharkhizc MJ, Eskandaria MH. Effect of *Satureja khuzestanica* essential oil on oxidative stability of sunflower oil during accelerated storage. Nat Prod Res 2012; 26(15): 1458-63.
56.Asnaashari M, Hashemi B, Mohammad S, Mehr HM, Asadi Yousefabad SH. Kolkhoung (*Pistacia khinjuk*) Hull oil and Kernel oil as antioxidative vegetable oils with high oxidative stability and nutritional value. Food Technol Biotechnol 2015; 53(1): 81-6.
57.Farahmandfar R, Amini A, Faghih Nasiri S, Asnaashari M. Influence of *Mentha piperita* L. extract in the quality of soybean oil during microwave heating. Iranian J Food Sci Technol 2018; 75(15): 201-16.
58.Moshiri Roshan A, Sari AA, Aghajani N. Optimization of the Ajowan seed aceton extract, extraction condition and it's effect on oxidative stability of crude soybeen oil. JIFT 2018; 5(3): 469-83.
59.Wang G, Shi G, Chen X, Chen F, Yao R, Wang Z. Loading of free radicals on the functional graphene combined with liquid chromatography–tandem mass spectrometry screening method for the detection of radical-scavenging natural antioxidants. Anal Chim Acta 2013; 802: 103-12.
60.Farahmandfar R, Asnaashari M, Sayyad R. Comparison antioxidant activity of Tarom Mahali rice bran extracted from different extraction methods and its effect on canola oil stabilization. J Food Sci Technol 2015; 52(10): 6385-94.
61.Delfanian M, Esmaeilzadeh Kenari R, Sahari MA. Utilization of Jjujube fruit (Ziziphus mauritiana Lam.) extracts as a natural antioxidants in stability of frying oil. Int J Food Prop 2015; 789-801.
62.Sobrinho ACN, De Souza EB, Rocha MFG, Albuquerque MRJR, Bandeira PN, Dos Santos HS, et al. Chemical composition, antioxidant, antifungal and hemolytic activities of essential oil from *Baccharis trinervis* (Lam.) Ind Crops Prod 2016; 84: 108-15.
63.58.Alizadeh Behbahani B, Shahidi F, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi SA, Mohebbi M. Antioxidant activity and antimicrobial effect of tarragon (Artemisia dracunculus) extract and chemical composition of its essential oil. J Food Meas Charact 2017; 11: 847-63.
64.Hassaan MS, Mohammady EY, Soaudy MR, El-Garhy HS, Mukhtar MM, Mohamed SA, et al. Effect of *Silybum marianum* seeds as a feed additive on growth performance, serum biochemical indices, antioxidant status, and gene expression of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. Aquac 2019; 509: 178-87.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Identification of Marigold(*Calendula officinalis* L.) Essence Compositions and Comparison of It's Antioxidant Effects with Butyl Hydroxy Toluene in the Stability of Canola Edible Oil

Izadi Z[1*], Mirazi N[2], Agha Alikhani M[3]

[1]Department of Horticulture Science and Engineering, Nahavand University, Nahavand, Iran, [2]Departments of Biology, Bu Ali Sina University, Hamadan, Iran, [3]Departments of Agrotechnology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: 21 Apr 2020 Accepted: 4 Oct 2020

Abstract

Background & aim: Canola oil is prone to oxidative damage due to its high unsaturated fatty acids. One way to prevent the oxidation of oils and fats is to add antioxidants. Since synthetic compounds are limited for their toxicity and carcinogenicity, as a result today, essential oils of medicinal and aromatic plants are considered as alternatives to synthetic antioxidants in food products due to their antioxidant properties.*Calendula officinalis* L. is a species of chicory that has many applications in food and pharmaceutical industries. The aim of the present study was to determine the composition of marigold essential oil and compare the antioxidant effects of it's essential oil with butyl hydroxy toluene in the stability of canola edible oil.

Methods: The present experimental study was conducted in Nahavand University in 2019. Essential oil was extracted from perennial herds using Clevenger apparatus by water distillation. Isolation and identification of the constituents of the essential oil were performed using gas chromatography and gas chromatographs connected to mass spectrometer. The amount of phenolic compounds in essential oils was also measured by Folin method.Antioxidant activity of essential oil was assessed by using diphenyl picrylhydrazyl (DPPH) method and β-carotene/linoleic acid system and compared with synthetic antioxidant butylated hydroxy toluene (BHT). Consequently, the effect of marigold essential oil was added to the non containing antioxidant canola oil at four concentrations (100, 200, 400 and 800 ppm) to determine antioxidant activity. Moreover, an oil sample without antioxidant and two oil samples containing 100 and 200 ppm BHT were prepared.The oils were kept at 60 °C for 35 days and peroxide, thiobarbitoric acid, acid and carbonyl values were measured every 7 day. Experimental data were analyzed using ANOVA by the SPSS version 20 software and mean comparison were done using Duncan's multiple range test.

Results: The most important compounds in marigold essential oil were alpha-cadinol (49.52%), gamma-cadinen (15.35%) and delta-cadinen (8.36%) respectively. The amount of phenolic compounds was 32.74.32±63.0 mg gallic acid per gram of essential oil. The IC50 of essential oil of this plant was 36.10±21.0 µg/ml, while this parameter was 19.10±14.9 µg/ml for BHT. Concentration of 800 ppm of essential oil of marigold showed better antioxidant activity than other concentrations of essential oil. It was also observed that antioxidant activity was dose dependent. In the study of antioxidant properties of different concentrations of marigold essential oil in canola oil, it was found that the highest antioxidant activity was related to the oil sample containing 800 ppm of essential oil, which was significantly different from BHT at 100 ppm had no ($p > 0.05$).

Conclusion: Marigold essential oil at a concentration of 800 ppm in canola oil had an antioxidant effect and could be a suitable natural antioxidant as an alternative to synthetic antioxidants in the oil industry.

Keywords: Marigold, Essential oil, Antioxidant activity, Canola oil, α-cadinol

[*]**Corresponding author:** Izadi Z, Department of Horticulture Science and Engineering, Nahavand University, Nahavand, Iran.

Email: armaghan_iza_2004@yahoo.com

Please cite this article as follows:

Izadi Z, Mirazi N, Agha Alikhani M. Identification of Marigold(*Calendula officinalis* L.) Essence Compositions and Comparison of It's Antioxidant Effects with Butyl Hydroxy Toluene in the Stability of Canola Edible Oil.. Armaghane-danesh 2020; 25(5): 579-602.